UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE

ANNÉE 1964 N° 112

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DES PSEUDOMONAS, AGHROMOBACTER ET ACINETOBACTER

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement en Décembre 1964

PAR

Christiane ESCAT - SUC

ASSISTANTE DE BACTERIOLOGIE

Travail de la Chaire de Bactériologie
de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

MEMBRES DU JURY

Mme	ENJALBERT	Président
MM.	ANDRIEU	Assesseurs
	VIRENQUE	
	MONNIER	
	DELAUDE	Suppléant

LA PHOTOCOPIE IMP.
10, rue Baour Lormian
TOULOUSE

1964

Christiane ESCAT - SUC

CONTRIBUTION A L'ETUDE BACTERIOLOGIQUE
DES PSEUDOMONAS, ACHROMOBACTER
ET ACINETOBACTER

La Photocopie Imp. - Thèse Médecine
in-8, 60 p., N° 112 - Toulouse 1964.

Christiane ESCAT - SUC

CONTRIBUTION A L'ETUDE BACTERIOLOGIQUE
DES PSEUDOMONAS, ACHROMOBACTER
ET ACINETOBACTER

La Photocopie Imp. - Thèse Médecine
in-8, 60 p., N° 112 - Toulouse 1964

Christiane ESCAT - SUC

CONTRIBUTION A L'ETUDE BACTERIOLOGIQUE
DES PSEUDOMONAS, ACHROMOBACTER
ET ACINETOBACTER

La Photocopie Imp. - Thèse Médecine
in-8, 60 p., N° 112 - Toulouse 1964.

Christiane ESCAT - SUC

CONTRIBUTION A L'ETUDE BACTERIOLOGIQUE
DES PSEUDOMONAS, ACHROMOBACTER
ET ACINETOBACTER

La Photocopie Imp. - Thèse Médecine
in-8, 60 p., N° 112 - Toulouse 1964

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547605_0004

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE

ANNÉE 1964 N° 112

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DES PSEUDOMONAS, ACHROMOBACTER ET ACINETOBACTER

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement en Décembre 1964

PAR

Christiane ESCAT - SUC

ASSISTANTE DE BACTERIOLOGIE

Travail de la Chaire de Bactériologie
de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

MEMBRES DU JURY

Mme	ENJALBERT	Président
MM.	ANDRIEU	Assesseurs
	VIRENQUE	
	MONNIER	
	DELAUDE	Suppléant

LA PHOTOCOPIE IMP.
10, rue Baour Lormian
TOULOUSE

1964

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

Doyen. . . . . M. LAZORTHES
1er Assesseur. . . . . M. BLANC
2e Assesseur. . . . . M. SOREL
Doyens honoraires. . . . . MM. GORSE, CALVET,

Professeurs honoraires. . . . . MM. LEFEBVRE, BRUSTI, RIBAUT, VALLOIS, TAPIE, DELAS, RISER, BUGNARD.

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale.	MM. MÉRIEL	Clinique O.R.L. et chirurgie maxillo-faciale.	MM. CALVET
Clinique médicale.	GADRAT	Clinique rhumatologique.	RUFFIÉ René
Clinique chirurgicale.	LAGROT	Accouchement et obstétrice sociale. .	PONTONNIER
Clinique chirurgicale et gynécologique.	FABRE Pierre	Anatomie.	THOMAS
Clinique chirurgicale et du cancer. .	GRIMOUD	Anatomie appliquée.	POULHÈS
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.	VIRENQUE	Anatomie pathologique.	FABRE Jacques
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique.	RIEUNAU	Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale.	N...
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire.	ENJALBERT	Biophysique médicale.	AUVERGNAT
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	BAZEX	Chimie biologique.	VALDIGUIÉ
Clinique des maladies de la tuberculose et path. interne.	MOREL	Electro-radiologie.	MARQUÈS
Clinique des maladies des voies urinaires.	LHEZ	Embryologie générale.	BROUSSY Jean
Clinique des maladies infectieuses. .	ANDRIEU	Histologie.	BIMES
Clinique médicale infantile et puériculture.	SOREL	Hydrologie thérapeutique et climatologique.	DARNAUD
Clinique médicale de la 1re Enfance.	BARDIER	Médecine sociale.	PLANQUES
Clinique de neuro-chirurgie.	LAZORTHES	Parasitologie.	BOUISSET
Clinique neurologique et psychiatrique.	GÉRAUD	Pathologie chirurgicale.	DAMBRIN
Clinique obstétricale.	GUILHEM Paul	Pathologie générale et médecine expérimentale.	SENDRAIL
Clinique odonto-stomatologique. . . .	CADENAT	Physico-chimie.	N...
Clinique ophtalmologique.	CALMETTES	Physiologie.	LAPORTE Yves
		Physiologie appliquée et pharmacologie.	BAISSET
		Propédeutique médicale.	LAPORTE J.
		Thérapeutique.	DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Bactériologie.	Mme ENJALBERT	Oto-Rhino-Laryngologie.	MM. CLAUX
Biochimie médicale.	MM. DOUSTE-BLAZY	Pathologie médicale.	BOULARD
Maladies infectieuses.	ARMENGAUD	Physique médicale.	BRU

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie pathologique.	MM. BOUISSOU	Parasitologie.	MM. RUFFIÉ Jacques
Histologie et Embryologie.	PLANEL	Physiologie.	MONTASTRUC
Ophtalmologie.	DÉODATI		

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie.	MM. BASTIDE	Hématologie.	MM. DUCOS
Anesthésiologie.	LARENG	Histologie et embryologie.	GUILHEM André
Carcinologie.	ESTRADE	Médecine générale.	RIBAUT
Chirurgie générale.	GÉDÉON	Pathologie expérimentale.	GLEIZES
	SARRAZIN	Physiologie.	BESSOU
Electroradiologie.	PONS	Physique médicale.	COMMANAY
		Pneumo-phtisiologie.	MIGUÈRES

AGREGES

Médecine générale.	MM. CALAZEL	Dermatologie et syphiligraphie.	MM. DUPRÉ
	RASCOL	Hydrologie.	DENARD
	LE TALLEC	Médecine légale.	GRÈZES-RUEFF
	RIBET	Neurochirurgie.	ESPAGNO Jacque
Chirurgie générale.	FICAT	Neurologie et psychiatrie.	GAYRAL
	PASQUIÉ	Obstétrique.	ESPAGNO Guy
	GAUBERT	Ophtalmologie.	BEC
	SOUQUET	Pneumo-phtisiologie.	DELAUDE

AGREGE LIBRE

Pathologie chirurgicale. . . . . M. DIEULAFÉ

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie.	Mme DULUCQ-MATHOU	Pharmacie chimique et pharmacodynamie.	MM. CAUJOLLE
Chimie analytique, toxicologie et hygiène industrielle.	MM. BOURBON	Pharmacie galénique.	STANISLAS
Chimie pharmaceutique.	BLANC	Zoologie.	ROUX
Matière médicale.	VINCENT		

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Botanique.	MM. ROQUES	Sciences naturelles.	Mme CAUJOLLE
Pharmacie.	COUTURIER		

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Microbiologie.	M. BREUILLAUD	Sciences physiques.	M. PITET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Chimie organique.	MM. BERTRAND	Zoologie.	M. GAYREL
Toxicologie.	BROUSSY G.		

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire principal. . . . . M. ROCHE
Secrétaire. . . . . M. BERRUT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891.)

A la mémoire de mon grand'père Etienne ESCAT,

A tous ceux de ma famille qui ont prêté et tenu ce serment avant moi,

A TOUS LES MIENS .

A NOTRE JURY DE THESE.

Madame le Professeur L. ENJALBERT

Monsieur le Professeur G. ANDRIEU
Professeur de clinique des Maladies Infectieuses
Officier de la Légion d'Honneur

Monsieur le Professeur J. VIRENQUE
Professeur de clinique chirurgicale infantile et orthopédie
Chirurgien des Hopitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur

Monsieur le Professeur J. MONNIER
Professeur de Médecine Sociale
Médecin des Hôpitaux

Monsieur le Docteur A. DELAUDE
Professeur Agrégé de Pneumo Phtisiologie
Médecin des Hôpitaux

A NOS MAITRES DE LA FACULTE ET DES HOPITAUX.

A NOS AMIS

AVANT - PROPOS

Voici quatre ans que nous avons été accueillie dans le laboratoire de Bactériologie par notre maître Monsieur le Professeur Andrieu.

Depuis cette époque, il nous a témoigné sa confiance dans notre participation à l'enseignement des travaux pratiques.

Sa paternelle bienveillance, constamment présente, crée dans son équipe une chaude amitié. Nous savons que malgré ses nouvelles charges il ne cessera de l'animer.

En le remerciant de nous avoir choisie comme élève, nous voulons l'assurer ici de notre très respectueuse affection.

C'est à Madame le Professeur Enjalbert que nous devons notre formation spécialisée. Elle est la conséquence de l'intérêt qu'elle ne cesse de susciter dans sa discipline parmi ses étudiants.

Elle nous a confié ce sujet de Thèse qui lui tient à coeur. Elle n'a cessé d'en surveiller l'exécution en nous aidant de ses conseils et de son expérience quotidienne de bactériologie clinique.

A ses côtés, dans la simplicité qui l'entoure, nous essayons d'acquérir le sens de l'essentiel et l'esprit de synthèse qui lui sont propres.

Qu'elle soit assurée de notre fidèle admiration et de notre fierté de compter parmi ses élèves.

Une affection filiale nous unit à Monsieur le Professeur Virenque, ami fidèle de notre père. Nous vous cotoyons depuis notre plus tendre enfance.

Si nos études médicales ne nous ont pas placée à vos côtés, nous avons toujours eu recours à vous dans les périodes difficiles.

Nous sommes particulièrement touchée que vous ayez, dans les moments présents, accepté de siéger à notre thèse. Pleine d'admiration pour votre courage, nous voudrions vous dire que nous vous aimons comme un père.

Monsieur le Professeur Monnier nous a fait l'honneur d'accepter de siéger à notre soutenance de thèse. Nous le remercions d'avoir bien voulu diriger l'élaboration critique d'un des chapitres de ce travail. Pour celui-ci, il ne saurait y avoir de meilleur juge.

Nous tenons à lui exprimer ici notre profonde admiration pour sa méthode, sa rigueur dans le travail et son honnêteté scientifique.

C'est à un double titre que nous sommes heureux de compter parmi nos juges, le Professeur Agrégé Delaude.

Proche de notre famille par le coeur et la parenté, il exerce des fonctions de Bactériologie clinique dans le domaine spécialisé de la Tuberculose où il fait autorité. Nous voudrions lui exprimer notre admiration pour son pragmatisme et son efficience. C'est tout naturellement que nous faisons appel à sa saine conception des réalités, chaque fois que nous avons besoin d'un conseil. Nous lui témoignons ici notre profonde affection dont il est depuis longtemps assuré.

Cette thèse n'aurait pu être menée à bien sans l'aide que nous avons trouvée dans le laboratoire de la Faculté.

Monsieur le Docteur Aversenq, longtemps chef de travaux pratiques, nous a dirigée pendant nos années d'étudiant et de candidat au diplôme avec science et bonté. Nous tenons à l'en remercier aujourd'hui.

Monsieur le Docteur Levrat nous a fait bénéficier avec gentillesse de sa grande érudition. Qu'il soit assuré de notre reconnaissance.

Madame le Docteur Lareng est pour nous un exemple quotidien de conscience professionnelle et de perfection dans l'exécution du travail.

Améliorant sans cesse l'enseignement des travaux pratiques, elle se dépense sans compter.

Elle ne nous a pas ménagé son aide dans la réalisation de notre thèse. Qu'elle soit assurée de notre respectueuse et fidèle amitié.

Nous remercions Monsieur le Docteur Bourse pour les suggestions critiques qu'il nous a apportées dans la composition de ce travail.

Elle sont le témoin d'un esprit prompt et original que nous avons eu maintes fois l'occasion d'apprécier.

Que Madame Moatti, adoptée immédiatement pour sa gentillesse et sa valeur tant humaine que technique par tout le laboratoire, soit assurée de notre amitié.

Mademoiselle le Docteur Lapchine, Madame le Docteur Didier, Madame le Docteur Génard sont pour nous les aînées et les compagnes quotidiennes de travail. Nous les assurons de notre cordiale sympathie.

Nous remercions Mademoiselle Onfray pour la partie de ce travail que nous lui devons entièrement. Sa gentillesse nous a touchée. Nous faisons une entière confiance à sa compétence. Nous la quitterons avec tristesse en l'assurant de notre amitié.

Madame Bellet nous a aidée dans le perfectionnement et la mise au point de techniques nouvelles. Nous voulons la remercier de son concours.

Les techniciens MM. Berthot, Barrière et Garrès ont accepté avec beaucoup de gentillesse, le surcroît de travail que notre thèse leur a imposé. Nous les en remercions vivement.

Ainsi, avec l'aide de tous, a pu être réalisé le travail de bactérillogie clinique que nous présentons aujourd'hui.

PLAN

INTRODUCTION .

CHAPITRE I : Revue critique de la Systématique.

CHAPITRE II : Matériel et Méthodes.

- Origine des souches.
- Méthodes :
  - Etude morphologique
  - Etude physiologique
  - Etude biochimique
  - Etude enzymologique
  - Etude de la sensibilité aux antibiotiques

CHAPITRE III : Résultats :

- Etude Analytique
- Etude Synthétique

CHAPITRE IV : Discussion :

- Caractères hétérogènes
- Caractères homogènes
- Caractères différentiels
- Terminologie adoptée
- Déduction posologique
- Plan d'examen rapide.

CONCLUSION .

INTRODUCTION

La fréquence des Infections dûes aux germes à Gram négatif s'est considérablement accrue ces dernières années, en Pathologie humaine.

Pour expliquer ces faits, on invoque essentiellement la multiplication et la complexité croissante des techniques d'exploration, de traitements et de réanimations tant médicales que chirurgicales.

L'usage très répandu des antibiotiques à "large spectre", surtout actifs sur les germes à Gram positif, conditionne la sélection de souches considérées jusqu'ici comme saprophytes inoffensifs.

Ces germes occupent à l'heure actuelle une place importante (1) en bactériologie clinique.

Parmi eux, une fois éliminés les pathogènes traditionnels, on se trouve en présence d'un groupe d'attente étiquetté suivant les auteurs : (1, 2, 3, 4, 5, 52), Pseudomonas, Achromobacter, Acinetobacter ou Moraxella.

Ces germes présentent en commun des caractéristiques particulières qui sont d'être :

- ubiquitaires,
- Gram négatif, souvent polymorphes
- Aerobies stricts,
- se développant sur milieu simple,
- poussant aisément à la température du Laboratoire,
- achromogènes sur milieux ordinaires,
- indifférents vis-à-vis du lactose à la concentration habituelle de 1 %.

On les sépare théoriquement en germes mobiles, de forme bacillaire (Pseudomonas, Achromobacter) et germes immobiles, de forme cocco-bacillaire, bien que cette distinction soit parfois malaisée (Acinetobacter ou Moraxella).

L'étude de cet ensemble de germes pose plusieurs problèmes indissociables et fondamentaux qui débouchent tous sur un problème de classification puisque leur place exacte dans la taxinomie est controversée. Mais cette place, pour les traités classiques de nomenclature, étant fonction des caractères morphologiques et culturaux des germes, la définition de ces derniers doit être rigoureuse.

Le problème de pigmentogénèse par exemple, se posera tant que l'on discutera de la qualité des milieux de culture à offrir à un germe microbien pour lui faire révéler son caractère pigmenté. Existe-t-il des germes authentiquement achromogènes sur milieux ordinaires qui perdent ce caractère lorsque toutes conditions sont remplies pour susciter l'élaboration de leur pigment ?

Le problème de la ciliature demandera à être examiné non seulement en fonction de la mobilité apparente du germe vivant, mais surtout d'après le nombre et la position des cils sur le germe coloré spécialement. Existe-t-il parmi ces germes des bacilles authentiquement péritriches ?

Un colloque récent a réuni des Bactériologistes de différentes disciplines à ce propos (7) montrant l'intérêt théorique de cette question.

De plus, la nécessaire qualité du travail pratique d'un Laboratoire de Bactériologie dans un Centre Hospitalier impose la mise au point de techniques rapides mais aussi sûres. L'appréciation d'une pigmentogénèse, d'une ciliature, doit se faire sans équivoque avant que les questions de nomenclature soient contrôlées ou affirmées par d'autres caractéristiques de ces germes.

CHAPITRE I

REVUE CRITIQUE DE LA SYSTÉMATIQUE

Avant d'entreprendre l'étude analytique de cet ensemble de germes, il convient d'essayer de les placer au sein des différentes systématiques françaises et anglo-saxones, actuellement en cours. Volontairement, nous ne retracerons pas l'historique particulièrement détaillée dans les travaux de THIBAULT (8), de CHASSIGNOL((9), de KAMBOU (10).

Nous envisagerons, d'après les caractères généraux que nous avons énoncés précédemment, la situation respective des germes mobiles et immobiles de ces groupes (Tableau I).

Nous indiquerons successivement pour deux auteurs, la famille, la tribu si elle existe, et le genre des espèces susceptibles de nous intéresser (BERGEY 1957, PREVOT 1961).

Même lorsqu'elles sont considérées par les auteurs comme non pathogènes pour l'homme il semble raisonnable de ne pas les éliminer à priori, étant donné l'évolution des infections humaines à germe Gram négatif.

La position de cet ensemble de germes dans les différentes systématiques, amène à formuler les remarques suivantes :

1°- Un certain nombre de faits semble bien admis par tous :

a) Le groupe est composé de germes ubiquitaires (espèces marines, phytopathogènes, du sol, de l'eau, commensales de l'homme).

b) Les germes s'y différencient en deux types morphologiques :

- soit mobiles, bacillaires, de forme allongée, proche des Pseudomonas par leurs caractères culturaux et biochimiques,

- soit immobiles, cocco-bacillaires, de forme trapue, proches des Acinetobacter-Moraxella par leurs caractères morphologiques.

2°- Il persiste des points obscurs :

a) d'ordre taxinomique. Les différents auteurs rapprochent, pour soutenir une opinion, des familles aussi différentes que celles des Brucellaceae (2), des Enterobacteriaceae (3), des Pseudomonadaceae (5) des Achromobacteraceae (2) et des Moraxellaceae (53),

TABLEAU I

GERMES IMMOBILES

BERGEY (2) 1957

FAMILLE des BRUCELLACEAE

Genre Moraxella

M. liquefaciens

M. bovis

FAMILLE ACHROMOBACTERACEAE

Genre Alcaligenes

A. viscolactis

Genre Achromobacter

A. parvulus

FAMILLE PSEUDOMONADACEAE

Genre Acetobacter

A. kuetzingianus

PREVOT (5) 1961

FAMILLE des PSEUDOMONADACEA

Tribu Pseudomonadeae

Genre Aplanobacter

A. cepivorum
A. robici

FAMILLE ACHROMOBACTERACEAE

Tribu Achromabactereae

Genre Acinetobacter

A. anitratum
A. nasalis
A. parvulus
A. viscolactis
A. winogradskyi

Sous-Germe Moraxella

M. lwoffi var. brevis, bacteroïdes, glucidolytica

M. bovis

TABLEAU I

GERMES MOBILES

BERGEY (2) 1957

FAMILLE PSEUDOMONADACEAE

Genre Pseudomonas

Ps. lasia
Ps. riboflavina
Ps. indoloxidans
Ps. membranoformis
Ps. halestorga
Ps. gardeniae
Ps solanacearum
Ps. fabea = phytomonas
Ps. iridicola
Ps. maublancü
Ps. polygoni
Ps. radiciperda
Ps. helianthi
Ps. melophtora
Ps. andropogoni
Ps. petasitis
Ps. eriobotryae

Genre Acetobacter

A. aceti
rancens
pasteurianus
oxydans

FAMILLE ACHROMOBACTERACEAE

Genre Alcaligenes

A. liquefaciens
xerosis
parvulus

PREVOT (5) 1961

FAMILLE PSEUDOMONADACEAE

Tribu Pseudomonadeae

Genre Pseudomonas

Ps. fragi
Ps. cohaerens
Ps. elongata
Ps. proteus
Ps. alginica

Genre Phytobacterium

Ph. fabae
Ph. zingiberi
Ph. cannae
Ph. astragali
Ph. iridicola
Ph. maublancii
Ph. helianthi
Ph. eriobotryae
Ph. andropogonis
Ph. lignicola
Ph. melophotora
Ph. colurnae
Ph. destructans

Tribu des Achromobactereae

Genre Achromabacter

A. liquefaciens
A. alcaligenes
A. xerosis
A. sewerini
A. halestorgus
A. indoloxidans

b) d'ordre terminologique. La lecture des principaux traités permet de dresser un tableau des synonymies trouvées pour les germes de ces groupes (Tableau II). On comprend les confusions et les méprises qui peuvent résulter de cette absence de clarté terminologique.

Pour tenter de résoudre ces divergences, le colloque annuel de la Société Française de Microbiologie (7) a été consacré à l'identification des Pseudomonas, des Achromobacter et des Bactéries analogues.

Bien qu'un certain nombre de problèmes n'ait pu être résolu, on doit en retenir quelques acquisitions importantes devenues nécessaires :

a) Etude différentielle de la glycolyse (séparation des types fermentaires et oxydatifs),

b) Application des méthodes enzymologiques réservées jusque là aux entéro-bactéries,

c) Appréciation exacte de la ciliature après coloration spéciale,

d) Utilisation de techniques nouvelles d'exaltation de la pigmentogénèse.

Ces différentes techniques rapides et aisées sont directement utilisables en bactériologie clinique.

Elles permettent d'entreprendre sur des bases plus solides une étude comparative de cet ensemble de germes. C'est dans cette perspective de pratique quotidienne que nous avons entrepris ce travail, en souhaitant ainsi participer à l'approche de la solution des problèmes taxinomiques fondamentaux qu'ils posent aux Bactériologistes.

TABLEAU II

SYNONYMIE

PORTANT SUR LES GERMES NON PIGMENTES

DES GROUPES PSEUDOMONAS - ACHROMOBACTER et ACINETOBACTER-MORAXELLA

	BERGEY (2)	PREVOT (5) BRISOU (4)	DUMAS (3)	BUTTIAUX (12)
Immobiles	Achromobacter	Acinetobacter (1954)	Moraxella	Achromobacter Bacterium Anitratum
Mobiles	Achromobacter Pseudomonas sans pigment	Achromobacter Phytobacterium	Alcaligenes fecalis	Pseudomonas sans pigment

CHAPITRE II

TRAVAUX PERSONNELS

I - ORIGINE DES SOUCHES

Dans les Laboratoires de la Chaire de Bactériologie de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse, nous avons étudié 45 souches de germes ayant les caractéristiques suivantes :

- Bâtonnets Gram négatif,
- Achromogènes en gélose nutritive,
- Non sérophiles,
- Sans action sur le lactose à 1 %,
- Aérobies stricts,
- D'origine humaine.

Ces germes proviennent du Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse. Ils ont été isolés dans la période s'étendant de 1959 à 1964, et sélectionnés, soit du fait de l'origine du prélèvement (sang, liquide céphalo-rachidien, liquide pleural, pus), soit en raison de leur présence exclusive ou largement prédominante dans des matériels biologiques variés (selles, urines, prélèvements pharyngés....). Toutes les souches ont été conservées par lyophylisation.

Leur répartition est la suivante :

Prélèvements (+)	Nombres
Sang	6
Moëlle sternale	1
Liquide céphalo-rachidien	7
Liquide pleural	7
Prélèvement pharyngé	5
Urines	1
Selles	2
Crachats	3
Pus	9
Origine inconnue	4

II - METHODES

L'étude de ces germes a été menée selon le plan d'examen traditionnel :

(*) Certains ont fait l'objet dans ce même Laboratoire de la thèse de Doctorat en Pharmacie de KAMBOU (10).

A - Etude morphologique
B - Etude Physiologique
C - Etude Biochimique
D - Etude Enzymologique
E - Etude de la sensibilité aux antibiotiques.

A - ETUDE MORPHOLOGIQUE.

1°- L'examen à l'état frais :

Il comporte un temps préalable :

Exaltation de la mobilité par la technique suivante :

- Ensemencement par une strie transversale dans une boîte de Petri contenant de la "gélose mobilité".

Peptone	10 grs
Cl Na	5 grs
Agar	5 grs
Eau	1000 ml

- Autoclaver 20' à 120° c

- Prélever après incubation de 24 heures une anse des germes ayant diffusé le plus loin de la strie d'origine.

- Emulsionner cette anse dans une goutte d'eau déposée à la surface d'une lame porte-objet.

Recouvrir d'une lamelle puis luter à la paraffine.

- Attendre la cessation des courants liquidiens.

- Examiner en contraste de phase (objectif 40).

Cette technique nous a paru nécessaire pour apprécier la mobilité; celle-ci ne pouvant s'observer microscopiquement en culot de gélose du fait de l'aérobiose stricte des germes étudiés.

2°- Coloration de Gram

3°- Coloration des Cils

Après avoir essayé plusieurs méthodes (LEIFSON (13), RHODES (14), préconisées par de nombreux auteurs (15, 8, 12, 16), nous avons finalement opté pour la technique plus ancienne de CASARES-GIL (17).

Voici le protocole que nous avons suivi :

a) Préparation de frottis :

Les lames porte-objets, neuves, doivent être soigneusement lavées à l'eau et au savon avant de séjourner 4 à 5 jours dans le mélange sulfochromique. Elles sont alors dégraissées et chimiquement propres. Lavées à l'eau courante, elles sont alors stockées en flacon de BORREL alcool-éther.

Au moment de l'utilisation, sortir une lame, sécher à la flamme.

Le germe à étudier ensemencé en gélose semi-solide est prélevé avec précaution loin de la strie d'ensemencement, grâce à une pipette fermée boutonnée;ceci afin de recueillir les germes les plus mobiles puisque l'on se place ainsi dans les meilleures conditions d'étude de la ciliature.

Effleurer de cette pipette la surface d'une goutte d'eau distillée placée sur la lame, laisser sécher à l'étuve sans fixer.

Nous préférons cette technique à la méthode plus traumatisante, utilisant la pipette capillaire ouverte.

b) Coloration

Nous avons utilisé le colorant dont la composition est la suivante :

Solution A

Tannin	10 grs
Chlorure d'Aluminium Hydraté	18 grs
Alcool à 70 %	30 ml

Solution B

Chlorurede Zinc	10 grs
Chlorhydrate de rosaniline	1,5 gr
Eau distillée	10 ml

Verser ensuite goutte à goutte en remuant la solution B dans la solution A. On obtient une solution mère qui peut être conservée très longtemps à la température du Laboratoire, à l'abri de la lumière.

Avant usage, mélanger une partie de la solution mère à trois parties d'eau distillée. Agiter, laisser reposer 10 minutes, filtrer.

- Déposer alors le colorant dilué et filtré sur le frottis, puis le laisser recouvrir entièrement la lame,
- Laisser en contact 2 minutes,
- Laver à grande eau sous le robinet,
- Surcolorer pendant 2 minutes à la fuchsine phéniquée de ZIELH, pure.
- Laver à grande eau;
- Sécher à l'étuve,
- Examiner à l'immersion.

c) Lecture

Les germes et leurs cils sont colorés en rose.

Malgré la fréquence de précipité de colorant, même et surtout pour des solutions fraîchement préparées, nous pensons que cette technique a un certain nombre d'avantages essentiels : ce sont la rapidité et la facilité d'exécution et la conservation illimitée du colorant.

4°- Examen des colonies.

Il a été pratiqué toujours sur un même milieu : gélose lactosée ournesolée à la dilution finale de 1 %.

La description des colonies tient compte de caractéristiques simples :

- grasse , muqueuse (G.M.)
- laiteuse, de type entérobactérie (L.E.)
- fine, laiteuse (F.L.)
- fine, transparente (F.T.)
- sèche (S).

B - ETUDE DE LA PHYSIOLOGIE DU GERME

1°- Appréciation de la température de culture

Chaque souche a été ensemencée en gélose nutritive inclinée à 37° et 22° et examinée au bout de 24 heures pour rechercher des colonies visibles à l'oeil nu ou à la loupe binoculaire x 20.

2°- Détermination du type respiratoire.

Nous avons suivi la technique préconisée par BUTTIAUX (12).

Des tubes contenant du milieu viande-levure gélosée exempt de nitrate, sur une hauteur de 100 mm., sont régénérés au bain-marie bouillant pendant 15 à 20 minutes. Ces tubes de milieu fondu sont alors ramenés à la température de 48°.

- Inoculer le germe dans toute la hauteur de la colonne avec l'effilure de pipette Pasteur scellée, par un mouvement hélicoïdal de haut en bas et de bas en haut.

- Solidifier immédiatement le milieu en plongeant les tubes dans l'eau froide.

La lecture est faite après 24 heures.

Les germes aérobies stricts ne poussent qu'en surface sur une hauteur ne dépassant pas 3 à 4 mm.

C - ETUDE BIOCHIMIQUE DES GERMES.

Nous décrirons successivement les réactions mettant en jeu les glucides, puis celles utilisant d'autres substrats.

1°- Réactions mettant en jeu les glucides.

Elles ont été appréciées sur le glucose, le maltose, le mannitol et le lactose.

a) Glucose.

Nous avons utilisé le milieu décrit par HUGH et LEIFSON (18).

- Trypticase (B.B.L.)	2 grs
- Na Cl	5 grs
- PO4 K2H	0,3 grs
- Agar	3 grs
- Bleu de Bromothymol	0,03 grs
- Eau distillée	1.000 ml

- Ajuster le pH à 7,2 si nécessaire. Répartir des culots de 5 cm de hauteur au moins. Autoclaver 20' à 120° C. Le milieu est régénéré au bain-marie bouillant pendant 15 à 20 minutes.

- Ajouter une solution de glucose de façon à obtenir une concentration finale à 1 %. Ramener à la température de 48°. Deux tubes sont ensemencés (cf. paragr. détermination du type respiratoire); un seul est recouvert d'huile de paraffine sur 1 cm de hauteur environ. Cette paraffine stérile réalise une anaérobiose totale. Nous avons apprécié la glycolyse au bout de 24 à 48 heures car nous n'avons pas observé de changements au delà de ce laps de temps, bien que le délai préconisé par BUTTIAUX soit au total de 10 jours (12) :

Lecture :

- un virage au jaune apparaissant dans les deux tubes avec et sans huile, témoigne d'un processus de fermentation.
- un virage au jaune se manifestant en surface dans le seul milieu non recouvert d'huile signe un processus d'oxydation.
- une absence de virage signifie que le germe est inerte.

D'autre part, nous avons chaque fois observé, en cas de germe inerte, un bleuissement plus ou moins intense dans le tube non recouvert d'huile.

La limite entre germes inertes et alcalinisants nous a paru difficile à apprécier. Nous avons donc seulement donné dans nos tableaux des résultats concernant l'oxydation marqués (+) ou le caractère inerte marqués (-).

b) Maltose

Nous avons utilisé le même milieu, la même concentration sucrée de 1 % et la même lecture que précédemment.

Nous avons constaté, comme le signalent HUGH et LEIFSON (18), que les germes qui oxydent le glucose, lorsqu'ils utilisent le maltose le font également par le même processus d'oxydation.

c) Mannitol

Nous avons utilisé le milieu classique Mannitol-mobilité, ensemencé par piqûre centrale en culot.

d) Lactose

1°- Lactose à 1 %

Le lactose a été incorporé à la gélose nutritive tournesolée de façon à obtenir une concentration finale de 1 % et coulée en boîte de PETRI. Rappelons que la description des colonies microbiennes est donnée sur ce milieu.

2°- Lactose à 10 %

Le lactose a été incorporé en gélose inclinée tournesolée jusqu'à une concentration finale de 10 % (24). Les tubes ont été examinés pendant trois semaines avant de considérer le résultat comme négatif.

2°- Réactions complémentaires.

a) Recherche de l'indole en eau peptonée ordinaire par le réactif d'EHRLICH-BOEHME après 24 heures d'incubation des cultures.

b) Mise en évidence d'un dégagement d'hydrogène sulfuré. Elle a été réalisée sur le milieu de KLIGLER à 2 sucres (lactose-glucose)+ fer.

c) Utilisation du citrate de sodium sur milieu de KOSER SIMMONS. (L'inoculation ayant été pratiquée au fil droit sur une seule strie centrale en surface, à partir d'une culture en milieu solide). Les résultats ont été enregistrés jusqu'au 10ème jour d'incubation.

d) Recherche d'une uréase en milieu de CHRISTENSEN (57). L'ensemencement a été fait en surface sur une seule ligne. Les résultats ont été notés chaque jour pendant six jours.

e) Mise en évidence de la réduction des nitrates en nitrites.

Elle a été pratiquée en eau peptonée nitratée :

- Nitrate de Potassium (exempt de nitrates)	0,2 grs
- Peptone	5 grs
- Eau distillée	1000 ml

- Autoclaver 20' à 120° C

- Ensemencement large du germe.

- Incubationo24 heures.

- Ajouter 4 à 5 gouttes des réactifs suivants :

- Acide sulfanilique	8 grs
- Solution d'ac. acétique N/5	1.000 ml
et de :	
- Alpha naphtylamine	5 grs
- Solution d'ac. acétique N/5	1.000 ml

Certains germes peuvent dépasser, dès 24 heures, le stade des nitrites et donner une réactions faussement négative. Pour en faire la preuve (19), nous avons ajouté dans les tubes donnant une réaction né-

gative, une pincée de poudre de zinc. Si les nitrates n'ont pas été réduits par la bactérie, ils le sont par la poudre de zinc et une couleur rose apparait. Si tous les nitrates ont été métabolisés, la teinte du milieu reste inchangée.

f) Teste du rouge de méthyl (R.M.) et mise en évidence d'Acétoïne (VOGES-PROSKAUER (V.P.) ont été étudiés en milieu de FOUAD (58).

- Glucose	5 grs
- Cl Na	5 grs
- P04 H K2	5 grs
- P04 H2 K	2 grs
- P04 H2 NH4	2 grs
- S04 Mg 7 H20	0,2 grs
- S04 Mn 4 H 20	0,02 grs
- Fe Cl 3	0,005 grs
- Eau distillée	1.000 ml

Répartir à raison de 5 ml par tube. Autoclaver 20 minutes à 120°C. Ces tubes ensemencés sont incubés 24 à 48 heures à 37°. 2 ml de cultures sont prélevés et répartis en deux tubes à hémolyse;

- Dans le premier tube, l'adjonction de quelques gouttes d'une solution de rouge de méthyl à 0,5 % dans l'alcool à 60° permet la lecture classique :

- teinte rouge = rouge de méthyl positif (R.M. +)
- teinte jaune = rouge de méthyl négatif (R.M. -)

- Dans le second tube, l'adjonction d'1 ml d'une solution de soude à 40 % dans l'eau et d'une pincée de créatinine après une agitation vigoureuse de quelques minutes, réalisent par la technique d'O'MEARA (12), le test de VOGES PROSKAUER :

- teinte rose devenant rouge : VOGES PROSKAUER positif(V.P.+)
- teinte inchangée : VOGES PROSKAUER négatif(V.P.-)

g) Test au cyanure de potassium (K C N)

Nous avons utilisé le milieu préconisé par BUTTIAUX (12).

- Peptone	10 grs
- Cl Na	5 grs
- P04 H Na2	5,63 grs
- P04 H2 K	0,22 grs
- Agar	1 gr
- Eau distillée	1000 ml

Répartir en tubes à raison de 2 ml.

Autoclaver 20' à 120°C

Au moment de l'emploi, ajouter 0,1 ml d'une solution de cyanure de potassium à 0,5 % dans l'eau.

L'inoculation a été faite de la façon suivante : le germe cultivé en eau peptonée pendant 18 à 24 heures est prélevé à la pipette Pasteur (sans aspirer), par simple capillarité) et émulsionné dans les tubes. Ceux-ci sont incubés 18 à 24 heures. Un disque blanc et net à la surface du tube signe la multiplication du germe et la positivité du test, dont la lecture paraît plus aisée que lorsque l'ensemencement du tube est fait à l'anse.

D - ETUDE ENZYMOLOGIQUE

Elle présente un avantage certain. Elle ne fait pas appel, comme les réactions biochimiques classiques à un milieu complexe et donc à plusieurs processus enzymologiques mal déterminés : L'étude des germes qui nous occupent est faite en face d'un substrat simple. Le résultat des réactions enzymologiques signe donc la présence ou l'absence d'un enzyme unique.

1°- Oxydase et Cytochrome oxydase.

On dépose sur une languette de papier Whatman n° 1, placée sur une lame porte-objets, une öse de culture microbienne prélevée sur gélose de 18 à 24 h.

Imprégner ensuite ce papier à l'aide d'une solution à 1 % de chlorhydrate de dimethyl-para-phénylène-diamine.

Une coloration rose intense survenant dans le dépôt des germes signe la positivité de la réaction.

On peut alors mettre en évidence de façon aisée la cytochrome oxydase (BRISOU) (22) en déposant ensuite, sur cette tâche, une goutte d'une solution alcoolique à 1 % d'alpha-naphtol. Une coloration bleue du dépôt microbien signe la présence d'une cytochrome oxydase.

Le nombre des résultats positifs obtenus par la recherche de la cytochrome oxydase ne nous a pas paru supérieur à celui donné par la recherche de l'oxydase.

2°- Lysine décarboxylase (L D C)

Nous avons utilisé la méthode de CARLQUIST modifiée par LE MINOR (23). La culture de 24 heures obtenue sur milieu de KLIGER est additionnée d'un ml. de lessive de soude N/2.

Les tubes maintenus en position inclinée sont agités durant 2' (66).
Ajouter 2 ml de chloroforme
Agiter doucement,
Laisser décanter 10' la phase chloroformique.

A l'aide d'une pipette Pasteur effilée surmontée d'une poire, on prélève la phase chloroformique (1 ml) que l'on dépose dans un tube à hémolyse.

Ajouter à celle-ci le même volume d'une solution de ninhydrine à 0,1 % dans du chloroforme.

Mettre à l'étuve (66) pendant 5'.

Une réaction positive se traduit alors par l'apparition d'une teinte allant du rose pâle au violet améthyste.

Avec RICHARD (66), nous n'avons pas observé de réactions faussement positives, survenant après ce laps de temps. Cet auteur signale uniquement des erreurs par défaut.

3°- Hydrolyse de l'Arginine.

Nous avons utilisé la technique de MÖLLER (12).

On prépare le milieu suivant :

- Peptone spéciale Orthana	5 grs
- Extrait de viande de boeuf	5 grs
- Pyridoxal	0,005 grs
- Solution aqueuse de pourpre de bromocresol à 1 pr 500	5 ml
- Solution aqueuse de rouge de crésol à 1 pr 500	2,5 ml
- Glucose	0,5 grs
- Eau distillée	1.000 ml

Ajouter :

1 % de L + arginine monohydrochlorhydrate.

Ajuster alors de pH à 6.

Mettre en tube de 8/120 mm à la raison de 1 ml par tube.

Autoclaver 15' à 120°C.

Ensemencer à partir d'une culture de 24 heures du germe en gélose nutritive à l'aide du fil droit.

Recouvrir d'huile de paraffine, étuve à 37° pendant 4 jours.

On observe chaque jour :

- Une coloration jaune, donc inchangée, signe la négativité de la réaction,
- Une coloration bleue violette signe la positivité de la réaction, donc une dihydrolyse de l'arginine.

4°- Transformation de Phényl Alanine en acide phényl pyruvique (19)

On émulsionne dans 4 gouttes d'eau physiologique la culture de 18 à 24 heures provenant d'une gélose nutritive.

Ajouter 4 gouttes de phényl alanine en solution aqueuse à 0,5 %. Laisser 10 minutes à 37° puis ajouter une goutte de perchlorure de fer officinal dilué au 1/3 dans l'eau distillée.

L'apparition d'une coloration verte immédiate et labile est caractéristique de la transformation de la phényl alanine en acide phényl-pyruvique.

La réaction s'écrit : A P P positif.

5° Gélatinose

La méthode utilisée a été celle de KOHN (20), modifiée par LAUTROP (59).

Les cubes de gélatine dénaturés par le formol, contenant du charbon de bois, ont été préparés selon le procédé de EWING (21).

La totalité de la culture microbienne d'un tube de gélose nutritive inclinée est émulsionnée dans un tube à hémolyse stérile contenant 3 ml d'eau distillée.

Ajouter un cube de gélatine, 2 à 3 gouttes de toluène, fermer le tube par un bouchon étanche stérile. Placé à 37°, le tube est observé chaque jour pendant 15 jours. La présence d'une gélatinase se traduit par la libération de la poudre de charbon.

Cette méthode rapide donne parfois un résultat dès la 12 ème heure.

6°- Beta galactosidase

Elle a été mise en évidence par la technique à l'orthonitrophényl beta-D galacto pyranoside ou encore O.N.P.G.

a) Solution tampon de $PO_4 H_2 Na$, H_2O à pH_7

Dissoudre 6,9 grs de $PO_4 H_2 Na$, H_2O dans 45 ml d'eau distillée Ajouter de la lessive de soude pure à 36° B pour ajuster le pH à 7; compléter à 50 ml avec de l'eau distillée. Conserver au réfrigérateur.

b) Solution d'O N P G M/75 dans la solution tampon précédente:

Dissoudre 80 mgrs d'O N P G dans 15 ml d'eau distillée portée à la température de 50°C. Laisser refroidir et ajouter alors 5 ml de la solution tampon précédente. Le mélange doit être incolore, le conserver au réfrigérateur.

Avant d'employer le mélange pour la réaction, l'abandonner durant quelques minutes à 37° pour remettre le phosphate en solution.

Le germe est prélevé sur gélose nutritive ou milieu de KLIGLER à l'aide de l'anse de platine et émulsionné dans 5 gouttes d'eau physiologique de façon à obtenir une suspension dense.

Ajouter une goutte de toluène, attendre quelques minutes, ajouter 5 gouttes de solution d'O.N.P.G.
Placer à l'étuve à 37°.

Préparer de la même façon un témoin certainement négatif (Proteus hauseri). La présence d'une beta galactosidase se traduit par l'apparition d'une coloration jaune franc. Celle-ci peut s'observer à partir de la 20ème minute.

Elle est stable et peut se lire après 24 heures.

Le témoin négatif doit rester incolore, même après 24 h à 37°.

E - METHODE D'ETUDE DE LA PIGMENTOGENESE

Nos souches, achromogènes en gélose ordinaire, ont été ensemencées et étudiées en deux milieux de culture favorables à l'exaltation de la pigmentogénèse des Pseudomonas.

Il s'agit des deux milieux de KING et coll. (25).

- Le milieu A est destiné à favoriser l'élaboration de la pyocyanine,
- Le milieu B celle du pigment fluorescent.

Milieu A -

- Bactopeptone	20 grs
- Agar	15 grs
- Glycérol C.P.	10 grs
- SO_4K_2 anhydre	10 grs
- Cl_2Mg anhydre	1,4 grs
- Eau distillée	1.000 ml

Ajuster le pH à 7,2, Autoclaver 20' à 120°C.

Milieu B -

- Protéose peptone n° 3	20 grs
- Agar	15 grs
- Glycérol C.P.	10 grs
- PO_4HK_2 anhydre	1,5 grs
- $SO_4MG\ 7H_2O$	1,5 grs
- Eau distillée	1.000 ml

Ajuster le pH à 7,2 . Autoclaver 20° à 120°C.

Ces milieux sont coulés en boîte de PETRI au moment de l'emploi. Après solidification, ils sont ensemencés de la façon suivante :

2 gouttes de la culture du germe en bouillon ordinaire sont déposées à la surface du milieu et étalées en nappe à l'aide d'une pipette Pasteur coudée (ou d'un étaleur).

Après incubation de 24 à 48 heures à 37°, la lecture des boîtes est faite de la façon suivante :

- La présence de pyocyanine se traduit par une teinte bleue-verte diffusant dans le milieu.

- La présence de pyoverdine, par l'apparition d'une fluorescence du milieu. Celle-ci est contrôlée par un examen en lumière de WOOD dans les cas de résultats douteux ou négatifs.

F - ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.

La méthode utilisée a été celle de la diffusion en gélose ou méthode des disques, la plus communément utilisée en bactériologie clinique. L'activité de l'agent antibactérien est appréciée ici par le

diamètre de la zone d'inhibition de croissance de la souche étudiée, que crée la diffusion de l'antibiotique à partir du disque de papier qui en est imprégné. Nous avons utilisé la technique pratiquée couramment au Laboratoire de Bactériologie Clinique de l'Hôpital de Purpan.

Le milieu de base est ici la gélose ordinaire à pH 7 coulée en boîte de PETRI en quantité suffisante pour réaliser une épaisseur de 3 ou 4 mm.

L'ensemencement est particulièrement délicat, car il est difficile d'obtenir les colonies à peine séparées qu'exige la méthode. La meilleure dilution nous a paru être une dilution allant du 1/100ème pour les germes à pousse délicate, au 1/1000ème d'une culture pure en bouillon de 24 heures. Une dilution plus faible donne pratiquement toujours une culture en nappe, une dilution plus forte réalise au contraire un ensemencement insuffisant, rendant la lecture malaisée.

1 cm3 de la dilution choisie est déposé au moyen d'une pipette Pasteur sur la boîte et réparti uniformément par simple inclinaison sur toute la surface de la gélose. L'excès d'inoculum aspiré à la pipette est rejeté. Il n'y a pratiquement pas de souillures si l'on a le soin d'opérer tout près d'un bec Bunsen.

On laisse sécher la gélose durant 15 minutes environ, à la température ordinaire et l'on dépose à la surface ensemencée les disques imprégnés d'antibiotiques à raison de 6 par boîte. Celle-ci est alors recouverte d'un papier filtre stérile qui double intérieurement son couvercle et absorbe l'eau de condensation. Le tout est placé à l'étuve à 37° sans retourner la boîte. La lecture peut s'effectuer après 16 heures d'incubation à 37°. Le diamètre de la zone d'inhibition noté autour de chaque disque est mesuré au moyen d'un compas à pointes sèches et reporté sur une règle graduée en millimètres. Il permet de dire si le germe est ou non sensible à l'antibiotique considéré, mais aucun chiffre de concentration active ne peut en être valablement déduit, étant donné les grandes différences de diffusibilité qui existent entre les antibiotiques.

Les disques que nous avons utilisés sont de deux sortes :

- nous nous sommes servis, en premier lieu, de disques préparés extemporanément suivant une technique dérivée de celle de SPAULDING (61). Ils sont réalisés par découpage à l'emporte-pièces, dans du papier Gauthier (9 mm de diamètre). On les stérilise par passage rapide au Poupinel; au moment de l'utilisation, chaque disque placé sur une feuille de papier filtre stérile est imbibé à l'aide d'une pipette Pasteur avec une à deux gouttes de solution d'antibiotique. L'excès est absorbé par le papier filtre sous-jacent et le disque immédiatement disposé à la surface de la gélose ensemencée.

Les dilutions stock d'antibiotiques sont faites, soit en solution tampon à différents pH, soit en alcool méthylique, suivant les antibiotiques. Les dilutions d'utilisation sont faites en eau distillée ensuite stockées au réfrigérateur au concentrations suivantes, directement utilisables :

Pénicilline G	25 mcg par ml
Oxacilline	50 mcg par ml
Ampicilline	50 mcg par ml
Streptomycine	1.000 mcg par ml
Kanamycine	400 mcg par ml
Chloramphénicol	500 mcg par ml
Tetracycline	250 mcg par ml
Novobiocine	10 mcg par ml
Erythromycine	500 mcg par ml
Spiramycine	500 mcg par ml
Pristinamycine	500 mcg par ml
Fucidine	100 mcg par ml
Rifamycine	100 mcg par ml

- nous avons également utilisé, en ce qui concerne la colistine, des disques commerciaux, préparés par l'Institut Pasteur. Ce sont des disques séchés de 10 mm de diamètre.

Ces tests de sensibilité par la méthode des disques ont été réalisés sur la totalité de nos souches.

Nos résultats, tout en tenant compte de l'imprécision inhérente à la méthode des disques sont exprimés de la manière suivante :

S = sensible = diamètre d'inhibition supérieur ou égal à 20 mm

L = limite = diamètre d'inhibition inférieur à 20 mm

R = résistance = pas de zone d'inhibition appréciable.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

I - ETUDE ANALYTIQUE.

L'ensemble de nos résultats est exposé dans le Tableau III.

L'étude de ce tableau permet de séparer les différents caractères bactériologiques de nos germes en trois rubriques :

- Certains caractères sont homogènes pour l'ensemble de nos germes. Ils en justifient l'étude commune (Lactose à 10 %, Pénicilline G).

- D'autres caractères très hétérogènes sont dépourvus d'intérêt pour l'ensemble des souches étudiées (Uréase, K C N).

- Les derniers caractères par contre semblent les plus intéressants. Il est logique de tenter grâce à eux une différenciation à l'intérieur de cet ensemble. Nous insisterons plus précisément sur les corrélations utiles entre les différentes caractéristiques étudiées.

A - CARACTERES COMMUNS (Tableau III)

A côté des caractères retenus pour la sélection de nos souches, notre travail nous a permis de retrouver d'une manière constante les résultats suivants :

- 4 caractères sont constamment négatifs

  - attaque du mannitol
  - présence d'indol
  - Test de VOGES PROSKAUER
  - Test du rouge de méthyle

- 1 seul caractère est constamment positif

  - l'attaque du lactose à 10 %.

Elle a lieu dans un délai allant de 24 h. à 3 semaines.

- 2 réactions enzymologiques sont toujours négatives :

  - O.N.P.G.
  - A.P.P. (1)

- L'étude de l'antibiogramme montre la résistance quasi-constante aux différentes Pénicillines, à la Novobiocine et à la Fucidine, la sensibilité à la Colistine.

---

(1) Signalons cependant une seule exception : elle concerne la souche 63 (Tableau III)

B - CARACTERES HETEROGENES (dans le Tableau III)

Il s'agit de trois points particuliers qui sont :

1°- La morphologie des colonies :

A l'examen macroscopique, nos colonies peuvent être schématiquement étiquetées suivant les différents aspects mentionnés plus haut.

L'absence totale de corrélation avec les autres caractères bactériologiques ne nous permet pas de retenir la forme de la colonie dans les critères de diagnostic bactériologique.

2°- L'hydrolyse de l'urée

Elle nous est apparue éminemment variable sur nos 30 premières souches, aussi nous avons renoncé à en poursuivre l'étude. Ce caractère ne figure pas dans notre tableau d'ensemble.

3°- Le test au cyanure de potassium

Il nous a permis de mettre en évidence 36 réponses positives. Il s'agit donc d'un caractère fréquemment positif mais cette positivité répartie de façon désordonnée est inutilisable ici.

C - CARACTERES UTILISABLES ET DIFFERENTIELS.

Ceux-ci seront donnés dans l'ordre suivi dans la composition du Tableau III.

Bien que mal aisé à interprêter, l'examen à l'état frais permet de diviser notre ensemble de germes en deux groupes :

- Premier groupe : les germes immobiles (23 souches)
- Deuxième groupe : les germes mobiles (22 souches)

Il sera toujours tenu compte de cette distinction d'ordre fondamental dans l'exposé de nos résultats.

A)- ETUDE MORPHOLOGIQUE

a) La coloration de Gram

Les germes immobiles sont tous cocco-bacillaires et leur groupement en diplo-bacilles est souvent caractéristique.

Dans la plupart des cas, il existe un grand polymorphisme avec présence de formes allongées ou même filamenteuses, associées aux formes courtes et trapues, simulant parfois des Neisseria.

Les germes mobiles. La coloration de Gram les révèle tous de formes plus allongées que précédemment, à bouts arrondis, droits ou légèrement arqués.

Cet aspect est régulier, si ce n'est pour la souche n° 63 presque cocco-bacillaire et les 6 souches n° 20, 33, 50, 29, 28, 37, dont les bacilles sont nettement plus fins que le type morphologique dominant.

b) La coloration de CASARES GIL (fig. 1)

- Les germes immobiles sont toujours non ciliés,
- Les germes mobiles, toujours ciliés, peuvent être séparés en trois types morphologiques.

- Le premier type morphologique, le plus courant, groupe 15 souches (N° 1, 22, 28, 39, 43, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65). Il s'agit de corps bacillaires allongés, monotriches dans tous les cas, avec parfois l'existence, pour une même souche, de cellules lophotriches (n° 1, 55, 43). Le nombre de cellules lophotriches est très faible par rapport au nombre de cellules monotriches.

Les n° 43 et 55 possèdent un système amphitriche. Dans 14 cas, les cils sont de longueur moyenne (2 à 3 oscillations). 2 souches sont munies de cils nettement plus courts, formant une seule boucle (n° 22 28).

- Le deuxième type morphologique groupe six germes (n° 20, 29, 32, 33, 37, 50).

Le système ciliaire est à la fois monotriche et lophotriche. Leur particularité réside dans la longueur de leurs cils : ceux-ci atteignent 4 à 5 oscillations.

- Le troisième et dernier type morphologique n'a été trouvé que dans un seul cas (souche n° 63). Il présente un système ciliaire, parapolaire indiscutable : 2 cils, parfois 1 seulement, sont implantés loin du pôle du bacille.

B)- LES AUTRES CARACTERISTIQUES UTILISABLES.

Les résultats de l'étude biochimique, enzymologiques, pigmentaire et de la sensibilité aux antibiotiques sont colligés dans 2 tableaux récapitulatifs (Tableaux IV et V).

La lecture du Tableau IV permet de noter que les caractères positifs sont rares, mais que les caractères constamment négatifs vont prendre une grande valeur pour la reconnaissance des germes immobiles.

La lecture du Tableau V permet de se faire une idée grossière de la sensibilité des deux groupes de germes à certains antibiotiques.

En effet, le pourcentage de résistance est considérablement plus élevé dans le groupe des mobiles, le pourcentage des sensibilités limitées est plus important dans les immobiles, surtout en ce qui concerne le sous-groupe non glucidolytique.

Le sous-groupe glucidolytique semble constituer du point de vue de la sensibilité aux antibiotiques, une forme de passage à du groupe des immobiles vers celui des mobiles.

TABLEAU IV

ETUDE ANALYTIQUE DES RESULTATS COHERENTS
CONCERNANT LA BIOCHIMIE , L'ENZYMOLOGIE et la PIGMENTOGENESE

		Immobiles 23	Mobiles 22
Glucose	+	11	11
	-	16	11
Maltose	+	0	6
	-	23	16
Nitrates	+	0	16
	-	23	6
Citrate	+	11	14
	-	12	8
Oxydase	+	0	16
	-	23	6
L.D.C.	+	0	6
	-	23	16
Arginine	+	0	13
	-	23	9
Gélatine	+	2	14
	-	21	8
Pigments	+	0	11
	-	23	11

TABLEAU V

ETUDE ANALYTIQUE DE L'ANTIBIOGRAMME						
	Immobiles (23)			Mobiles (22)		
	S	L	R	S	L	R
Ampicilline	1	6	16	1	0	21
Streptomycine	4	10	9	3	6	13
Kanamycine	8	6	9	4	3	15
Chloramphénicol	15	6	2	5	13	4
Tetracycline	7	9	7	4	4	14
Colistine	13	10	0	21	1	0
Macrolides	4	17	2	1	3	18
Rifamycine	1	18	4	1	3	18
TOTAUX	53	82	49	40	33	103

S = sensible
L = sensibilité limite
R = résistant.

II - ETUDE SYNTHETIQUE.

Au terme de cette étude analytique, nous avons entrepris d'établir des corrélations basées sur les seuls caractères utilisables.

Ainsi, peuvent être définis des groupes de germes ayant des caractéristiques bactériologiques uniformes (Tableau VI) et pour lesquels on peut définir des Antibiotypes suggestifs.

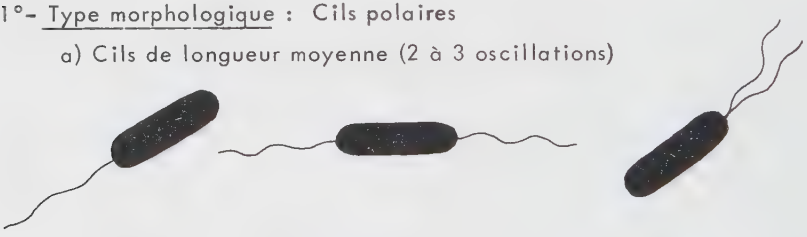
Ces résultats méritent une discussion qui sera l'objet de notre prochain chapitre.

FIGURE 1

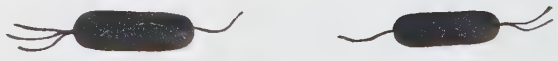
Les 3 types morphologiques rencontrés parmi nos 22 souches mobiles.

1°- Type morphologique : Cils polaires

a) Cils de longueur moyenne (2 à 3 oscillations)



b) Cils courts (1 seule boucle)



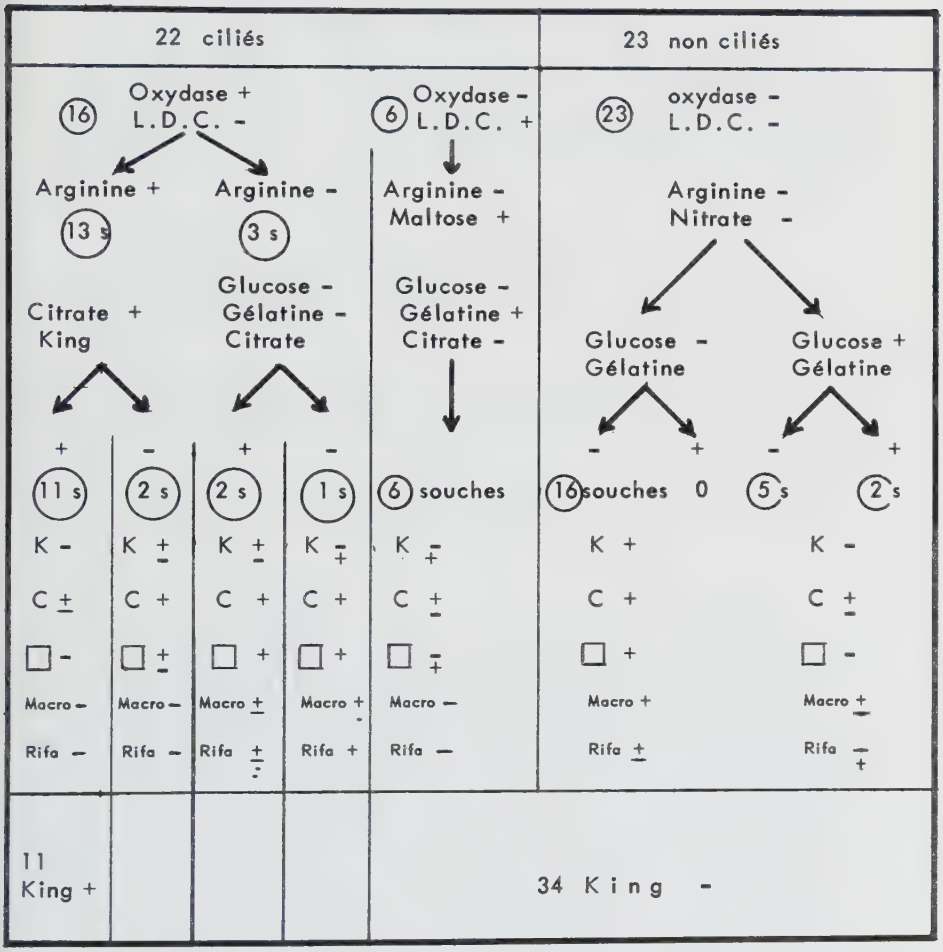
2°- Type morphologique : polaire

Cils très longs (4 à 5 oscillations)

3°- Type morphologique : parapolaire

TABLEAU VI

ETUDE SYNTHETIQUE
DES RESULTATS CONCERNANT LES CARACTERES CONSTANTS
DE CHAQUE GROUPE ET LEURS ANTIBIOTYPES



K = Kanamycine
C = Chloramphénicol
□ = Tétracycline
Macro = Macrolides
Rifa = Rifamycine

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Nous nous proposons de discuter, à la lumière des données récentes de la littérature, les résultats que nous venons de détailler dans une étude analytique, puis une étude synthétique du tableau d'ensemble n° III.

Nous essaierons de répondre aux cinq questions suivantes :

1°- Les caractères hétérogènes que nous avons considéré comme dépourvus d'intérêt le sont-ils réellement ?

2°- Les caractères homogènes pour l'ensemble des germes étudiés constituent-ils une base solide pour défendre le concept de l'autonomie de ce groupe ?

3°- Les caractères différentiels que nous avons isolés permettent-ils de manière fidèle et pratique une distinction et une subdivision valable ?

A l'appui de ces discussions :

4°- Comment situer théoriquement l'ensemble de ces germes dans les classifications bactériennes à côté des autres bacilles à gram négatif, plus couramment rencontrés en pathologie humaine ?

5°- Comment parvenir à un diagnostic bactériologique rapide, pratique, utilisable pour le Laboratoire usuel ?

1°- CARACTERES HETEROGENES

a) L'hydrolyse de l'urée

Nos résultats sont en accord avec ceux des principaux auteurs. VERON (15), place les résultats de ce test dans les caractères variables des Pseudomonas pigmentés; CHASSIGNOL (9), note seulement 13 résultats positifs au bout de 24 heures, sur 214 germes immobiles étudiés.

Il nous semble donc que cette réaction pourraît être désormais écartée de la galerie d'étude de cet ensemble de germes.

b) Le test au cyanure de potassium

Intéressant dans l'identification des entérobactéries, ce test s'est révélé inutilisable dans notre ensemble de germes. En effet, l'inconstance de sa positivité (38 sur 46), répartie de manière irrégulière, ne nous permet pas de le considérer comme une épreuve ayant de l'intérêt.

II - CARACTERES COMMUNS HOMOGENES

Ils constituent la base du diagnostic positif de cet ensemble de germes. Nous discuterons successivement les réactions biochimiques et enzymatiques, puis les données de l'antibiogramme. Nous tenterons d'établir une hiérarchie des valeurs de ces différentes épreuves en bactériologie pratique.

a) Réactions biochimiques et enzymatiques

1°- L'indol, le V.P., le R.M., le mannitol, constamment négatifs comme on pouvait s'y attendre à la lecture de la littérature nous paraissent constituer des épreuves d'intérêt secondaire.

2°- L'A.P.P. s'est révélé négatif. C'est une méthode pour les résultats de laquelle nous sommes en accord avec les données de la littérature. Une seule exception est à noter : elle concerne le seul germe présentant avec un A.P.P. positif, toutes les caractéristiques d'un Alcaligene fecalis, comme nous le verrons par la suite.

3°- Le lactose à 10 % et l'O.N.P.G. méritent une discussion plus importante et comparative.

Il faut remarquer que nos germes qui n'attaquent pas le lactose à 1 % sont par contre régulièrement actifs vis-à-vis du lactose à 10 % (15,8). Cette oxydation est particulièrement rapide dans le cas des germes immobiles glucidolytiques (9).

Ce phénomène peut être interprété dans le cadre de l'induction enzymatique (Monod 27) comme dû à la présence d'enzyme "adaptatifs" (KARSTROM) (28). On était alors en droit d'attendre une réaction à l'O.N.P.G. positive (29) en particulier lorsqu'elle a été pratiquée avec les germes prélevés directement sur la gélose hyper-lactosée. Ces germes mutants, de LOWE (30) seraient, comme on aurait pu s'y attendre, des mutants perméase positive.

Or, nos résultats ont été négatifs. Nous interprêtons ces réactions d'O.N.P.G. négatives comme correspondant à l'absence d'une beta galactosidase et on peut penser que l'attaque du lactose en phase aérobie doit ici faire appel à d'autres systèmes enzymatiques.

Malgré sa lenteur d'apparition dans certains cas, nous considérons donc que l'association d'une réaction positive en milieu hyper lactosé et d'un test à l'O.N.P.G. négatif, constituent un critère de valeur dans le diagnostic bactériologique de cet ensemble de germe.

b) l'Etude de la sensibilité aux antibiotiques.

Si on tient compte que des résultats communs à toutes nos souches, l'antibiogramme n'est pas un appoint important dans le diagnostic positif : en effet, la résistance aux différentes pénicillines, la sensibilité nette à la colistine, sont la règle pour les germes à Gram négatif.

Sur ces points, nos résultats sont en accord avec ceux des autres auteurs (31, 9).

Par contre, nous verrons dans le paragraphe suivant que la sensibilité à certains antibiotiques peut avoir une valeur d'appoint dans la différenciation des groupes.

III - CARACTERES DIFFERENTIELS ET UTILISABLES

Ce sont ceux qui présentent un intérêt majeur pour atteindre à la solution du problème que nous nous sommes posé.

Nous envisagerons successivement :

A - Les caractères de différenciation des groupes.

B - Puis ceux permettant une subdivision en sous-groupes.

A - LES CARACTERES DE DIFFERENCIATION EN GROUPES

Dans l'ordre suivant, nous discuterons :

1°- Les critères morphologiques,

2°- La réduction des nitrates,

3°- L'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

1°- Critères morphologiques

a) La coloration de Gram. L'aspect cocco-bacillaire constant du 1er groupe de nos germes est d'une utilité certaine dans la différenciation.

En ceci, nous sommes bien d'accord avec les descriptions des auteurs.

Par contre, jamais nous n'avons mis en évidence, comme il est couramment signalé (32, 33, 9) de cellules gardant le Gram.

L'aspect bacillaire du 2ème groupe est indéniable, conforme à la littérature, avec des formes droites, mais parfois aussi, légèrement arquées, comme l'ontsignalé DAVIS et PARK (60) au sujet des Pseudomonas, Aéromonas et Comanonas. Nous pensons que, malgré cette morphologie,dûe semble-t-il à unartefact de coloration ou de mordançage, le diagnostic de Vibrion ne peut être soulevé (12). Le diagnostic différentiel en sera évoqué plus loin.

b) Etat frais - Nous avons signalé dans nos résultats, les difficultés d'interprétation de la mobilité de ces germes : les germes du pre-

mier groupe sont agités parfois de mouvement browniens qui peuvent prêter à confusion. LAUTROP (34), PIECHAUD (35)ensuite, ont soulevé le problème de la mobilité chez les Acinetobacter-Moraxella, en leur attribuant une cause et un aspect très particuliers. Quand il s'agit des germes du groupe des mobiles, peu d'éléments sont cinétiques, parfois il faut examiner plusieurs champs du microscope avant decpercevoir une cellule en mouvement net (8). Ces cas difficiles sont cependant l'exception et la plupart du temps, l'examen à l'état frais permet une appréciation facile et indiscutable de la mobilité que nous avons contrôlé dans tous les cas par l'étude de la ciliature.

c) La coloration des cils. Elle nous a montré un premier groupe constamment non cilié (32,33) et la présence de cils dans le 2 ème groupe, ce qui sépare de façon fondamentale nos résultats en 2 zones distinctes.

2°- Etude de la réduction des nitrates.

La réduction des nitrates constamment négative dans le premier groupe non cilié, est variable dans le 2ème. Notre expérience corrobore les résultats des différents auteurs (15, 8, 33, 32). C'est donc un test important :

un germe non sérophile, insensible à la pénicilline s'il est nitrate positif peut faire partie du premier groupe.

3°- Etude de la sensibilité aux antibiotiques.

Un fait important mérite d'être signalé : la sensibilité quasi constante du premier groupe aux macrolides. Le même fait est signalé dans les travaux de CHABERT, COURTIEUX (31) et CETIN (51).

Nous avons volontairement laissé de côté la technique de SHEWAN (47) qui met en évidence dans des conditions de dilution du germe très différentes de celles de l'antibiogramme classique, la sensibilité des germes immobiles à la pénicilline. Cette technique nous a paru longue et peu utilisable en pratique courante.

B - CARACTERES PERMETTANT UNE SUBDIVISION A L'INTERIEUR DES GROUPES.

- Germes non ciliés
- Germes ciliés.

1°- Etude comparative de la L.D.C. et de l'Oxydase.

Les résultats sont superposables à ceux de nombreux auteurs (8, 9, 15, 33). Les deux réactions enzymatiques doivent être comparées.

a) Lorsque les résultats sont négatifs de manière concordante, on est toujours en présence d'un germe immobile.

Un germe oxydase négatif, L.D.C. négatif, non sérophile insensible à la Pénicilline, ne peut être que du premier groupe.

b) Lorsque les résultats sont divergents, le germe est mobile :

Un germe non sérophile, insensible à la pénicilline et présentant une réaction dissociée vis-à-vis de ces deux enzymes ne peut être que du deuxième groupe.

1°- Si le germe est oxydase négatif, L.D.C. positif, les autres réactions sont homogènes pour le sous-groupe dont il fait partie.

2°- Si le germe est oxydase positif L.D.C. négatif, on ne peut aller plus loin dans l'identification, sans faire appel à l'étude de la pigmentogénèse.

2°- La pigmentogénèse.

Les milieux de KING permettent de dépister des Pseudomonas pigmentés. Nous n'avons pas rencontré de pseudomonas pigmenté immobile et non cilié (2,68).

Par contre, la variabilité dans la production des pigments est vérifiée une fois de plus. Le phénomène inverse de dépigmentation a pu être mis en évidence par LUTZ (36). Cet auteur a noté un arrêt de la pigmentogénèse in vitro sous l'action des antibiotiques.

ANDRIEU (37) a fait les mêmes constatations in vivo. Malgré les milieux de KING, d'autres germes sont achromogènes de manière incontestable. Pour les germes immobiles, ce n'est donc qu'un caractère de confirmation attendue.

Il en est de même pour les germes mobiles, en ce qui concerne le sous-groupe oxydase (-), L.D.C. (+). Pour le sous-groupe oxydase (+) L.D.C. (-) non pigmenté, il est nécessaire de faire appel à l'étude de la dihydrolyse de l'arginine.

3°- Etude de l'hydrolyse de l'arginine.

D'autres méthodes que celles de MÖLLER ont été plus récemment proposées : SHERRIF et Coll (69) ont mis au point un test qualitatif et quantitatif. HORMAEKCKE et MUNILLA (73) ont utilisé le test de MÖLLER sans pyridoxal.

THORNLEY (70) a mis au point un milieu ne contenant ni glucose ni pyridoxal.

TAYLOR et WHITBY (71) ont utilisé la méthode de THORNLEY avec et sans paraffine : la réaction est nettement plus fidèle en présence de paraffine du fait des conditions de stricte anaérobiose nécessaires à la mise en évidence de l'activité de la dihyodrolase de l'Arginine.

BUTTIAUX (33) PIECHAUD (32) et TAYLOR (69) soulignent le caractère constamment négatif de cette réaction chez les germes immobiles. VERON (15) considère la positivité de ce test comme un des

caractères constants des Pseudomonas pigmentés. Il est sur ce point en désaccord avec BRISOU (68).

BUTTIAUX (33) défend l'existence de Pseudomonas sans pigments et considère que la positivité de l'hydrolyse de l'arginine est un argument en faveur de ce concept. Il existerait des Pseudomonas réellement non pigmentés Arginine (+).

Notre expérience confirme ces différentes opinions. Nous apportons deux faits intéressants :

a) Dans le sous-groupe $\begin{matrix}\text{oxydase (+)}\\ \text{L.D.C. (-)}\end{matrix}$ achromogène, nous pensons que l'absence d'une dihydrolase de l'arginine permet d'éliminer un Pseudomonas non pigmenté et place sur la voie de l'identification d'un germe du type Alcaligenes fecalis. Nous sommes en accord avec les résultats de TAYLOR (69).

b) Dans le sous-groupe $\begin{matrix}\text{oxydase (-)}\\ \text{L.D.C. (+)}\end{matrix}$ l'arginine est constamment négative.

Ces faits nouveaux semblent bien réaliser les espoirs de THIBAULT (8) à ce sujet.

Les autres réactionscdonnent des résultats qui viennent confirmer cette hypothèse.

4°- Autres tests

Trois autres réactions sont utiles dans les différents sous-groupes, soit à titre de confirmation, soitcparce qu'elles permettent une subdivision plus poussée :

Ce sont :

- l'étude de l'oxydation du glucose,
- l'étude de la liquéfaction de la gélatine,
- l'étude de l'utilisation du citrate.

a) Oxydation du glucose.

- Pour les germes immobiles, il n'y a pas de discussion possible, nos résultats sont en accord total avec tous les auteurs (32, 33), permettant une subdivision en glucidolytiques et non glucidolytiques.

- Pour les germes mobiles, quelques remarques s'imposent :

- le sous-groupe $\begin{matrix}\text{oxydase (-)}\\ \text{L.D.C. (+)}\end{matrix}$ est toujours glucose (-) (8)

- le sous-groupe $\begin{matrix}\text{oxydase (+)}\\ \text{L.D.C. (-)}\end{matrix}$ a un comportement variable vis-à-vis du glucose.

Mais il est important de noter que les germes considérés comme n'étant pas des Pseudomonas, achromogènes et arginine (-) sont toujours glucose(-).

VERON (15) considère que l'oxydation du glucose n'est pas un caractère constant des Pseudomonas et nous ne l'avons pas notée pour les Arginine (+) dans notre tableau V.

b) Liquéfaction de la gélatine.

Une méthode plus rapide que celle utilisant les disques de KOHN vient d'être récemment proposée par LE MINOR et PIECHAUD (73), LAGODSKY (74).

Elle donnerait des résultats dès la première heure.

Nous n'en n'avons encore aucune expérience personnelle.

Les résultats de la liquéfaction de la gélatine sont conformes à ceux publiés dans la littérature :

- le comportement vis-à-vis de la gélatine est variable à l'intérieur des sous-groupes, sauf en ce qui concerne :

le sous-groupe oxydase (-) L.D.C. (+) (gélatine constamment liquéfiée)

et les germes oxydase (+) L.D.C. (-) arginine (-) où la gélatine n'est jamais attaquée.

c) L'utilisation du citrate de sodium

1°- Germes immobiles :

Ce test est en corrélation avec la présence d'une glycolyse, PIECHAUD (32) pense que l'utilisation du citrate est directe et constante dans les variétés glycydolytiques.

Des mutants citrate (+) peuvent, selon cet auteur, être observés dans le cas de germes non glucydolytiques (4 citrates (+) sur 12 dans notre travail).

2°- Germes mobiles.

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature.

- L'utilisation du citrate est aussi un caractère constant des Pseudomonas pigmentés (15).

- Le sous-groupe oxydase (-) L.D.C. (+) maltose (+) est toujours citrate (-) (8).

- Le sous-groupe oxydase (+) L.D.C. (-) achromogène a un comportement variable.

Si les germes hydrolysent l'arginine, le citrate est toujours utilisé (33). Ce résultat est superposable au comportement des Pseudomonas pigmentés.

Si les germes n'hydrolysent pas l'arginine, le citrate peut être soit (+) soit (-).(8)

Nous verrons plus loin que la modalité de cette réponse est en corrélation avec le type morphologique ciliaire.

5°- Caractères permettant une identification précise.

Ces tests correpondent à des caractères spécifiques de certains germes et constituent la dernière étape avant de proposer une terminologie.

a) L'oxydation du maltose.

Ce test est constamment (-) chez les germes immobiles. Ce résultat est en accord avec l'expérience de CHASSIGNOL.(9).

Parmi les germes mobiles, s'il est toujours négatif dans :

le sous-groupe $\begin{matrix}\text{oxydase (+)}\\ \text{L.D.C. (-)}\end{matrix}$

il permet dans le sous-groupe $\begin{matrix}\text{oxydase (-)}\\ \text{L.D.C. (+)}\end{matrix}$ l'individualisation de l'espèce décrite par HUGH et RYSCHENKOW (38).

b) La répartition ciliaire et les différents aspects des cils.

L'appréciation de la ciliature en accord avec les données biochimiques, permet l'identification des différentes variétés de germes mobiles :

1°- Les Pseudomonas pigmentés possèdent, sans discussion, un système polaire monotriche ou, plus rarement lophotriche à l'intérieur d'une même souche. Nous sommes en accord sur ce point avec VERON (15).

Aussi la différenciation de GALARNEAULT et LEIFSON (39) entre Lophomonas et Pseudomonas, basée sur la seule ciliature, nous semble aléatoire.

2°- Les germes non pigmentés :

a) Germes $\begin{matrix}\text{oxydase (+)}\\ \text{L.D.C. (-)}\end{matrix}$ Ils sont munis d'un système ciliaire variable, polaire ou parapolaire.

1°- Cils polaires.

- Certains germes arginine (+) sont strictement comparables aux Pseudomonas pigmentés.

- Les autres possèdent des cils nettement plus courts et amphitriches. Ils sont arginine (-) citrate (-).

2°- Cils parapolaires .

Une de nos souches présentait un système parapolaire identique à ceux des germes décrits par THIBAULT (8). Cette souche étant arginine (-) citrate (-) elle semble bien correspondre au type Alcaligenèse fecalis peritriche, variété rare (6 sur 40 dans la statistique de MOORE et PICKETT (16) et discutée que certains proposent d'inclure dans le genre Comamonas (56). On comprend la position de BRISOU (4) qui a fait disparaître le genre Alcaligenes en le transformant en espèce.

Cette subdivision en cils polaires et parapolaires, suppose qu'un même germe ne puisse avoir qu'un même type. Or, BUTTIAUX (40) a décrit pour un même germe, la co-existence de cellules péritriches et polaires suivant la composition du milieu, LEIFSON et HUGH (41) suivant l'âge du germe.

Pour notre part, nos examens ont toujours été faits dans les mêmes conditions et la corrélation avec les réactions biochimiques et enzymatiques s'avèrant étroites, la valeur discriminative du système polaire et parapolaire nous parait fondée.

b) Germes $\begin{matrix}\text{oxydase (-)}\\ \text{L.D.C. (+)}\end{matrix}$ Ils présentent une morphologie ciliaire univoque caractérisée par des cils longs (8).

En résumé, l'étude comparative de ces différentes techniques permet d'aboutir à un classement satisfaisant de tous nos germes, confirmé par l'étude de leur Antibiotype (Tableau VI). Il reste cependant à leur affecter une terminologie.

IV - TERMINOLOGIE PROPOSEE

Nous avons critiqué dans un chapitre précédent les systématiques classiques dans lesquelles n'intervenaient pas les réactions enzymatiques désormais indispensables.

De même BUTTIAUX, dans son Manuel de Technique Bactériologique (12) ne mentionne pas l'existence des germes mobiles,

$\begin{matrix}\text{oxydase (-)}\\ \text{L.D.C. (+)}\end{matrix}$ qui tiennent pourtant une place importante dans notre travail (*)

Nous avons finalement abouti au diagnostic suivant : (OLIVIER 42).

1°- Les germes immobiles cocco-bacillaires achromogènes $\begin{matrix}\text{oxydase (-)}\\ \text{L.D.C. (-)}\end{matrix}$ nitrate (-) peuvent être désignés sous le terme de Moraxella-Acinetobacter, terme rendant mieux compte de leur immobilité. Nous n'avons jamais rencontré de Moraxella non serophile, oxydase + nitrate +.

- Quand ils sont sans influence sur le glucose, pour la seule variété non liquéfaciens que nous ayons rencontré (souches 2, 5, 7, 9, 10, 13, 17, 24, 25, 26, 27, 40, 41, 42, 45 et 47) il s'agit de Moraxella-Acinetobacter Lwoffi.

- Quand ils oxydent le glucose, nous avons retrouvé les deux variétés :

  - liquéfaciens (souches 3 et 6)

  - non liquéfaciens (souches 11, 12, 18, 21 et 23)

de ces Morexella ou Acinetobacter glucydolitica.

(*) Remarquons que selon cet auteur, Alcaligenes fecalis est un germe aéro-anaérobie.

2°- Les germes mobiles doivent être distingués d'après la pigmentation.

a) Les uns pigmentés, sont d'authentiques pyocyaniques désignés sous le terme de Pseudomonas fluorescens qui liquéfie la gélatine(souches 55, 56, 58, 60, 61, 64 et 65) et Pseudomonas putida sans action sur celle-ci (souches 1, 39, 57, 59).

b) Les autres sans pigments, doivent être distingués d'après les résultats des réactions de l'Oxydase et de la LDC en :

1°- Sous-Groupe Oxydase (-)
L.D.C. (+)

Ils correspondent aux descriptions de LYSENKO (55) sous le terme de Pseudomonas synxantha et de HUGH et RYSCHENKO (38) sous le terme de Pseudomonas maltophilia.

Ne possédant pas les caractères des Pseudomonas tels que nous les avons définis nous préférons les ranger dans le genre Achromotacter.

Nous adopterons donc le terme d'Achromobacter maltophilia pour les souches 33, 20, 50, 37, 32 et 29).

2°- Sous-Groupe Oxydase (+)
L.D.C. (-)

Ils doivent être classés suivant la décarboxylation de l'arginine en Arginine (+) qui sont des Pseudomonas sans pigments (souches 43, 62) (*) Arginine (-).

La coloration des cils surtout et l'utilisation du citrate accessoirement, permettent les diagnostics respectifs de COMANONAS (souches 22, 28) et d'Alcaligenes fecalis (souche 63) pour ces germes qui sont à séparer des Pseudomonas non pigmentés.

V - DEDUCTIONS NOSOLOGIQUES

Il nous paraît important, à la lumière des tests utilisés, d'envisager la situation de l'ensemble de nos germes maintenant identifiés par rapport aux germes Gram négatif isolés en bactériologie humaine.

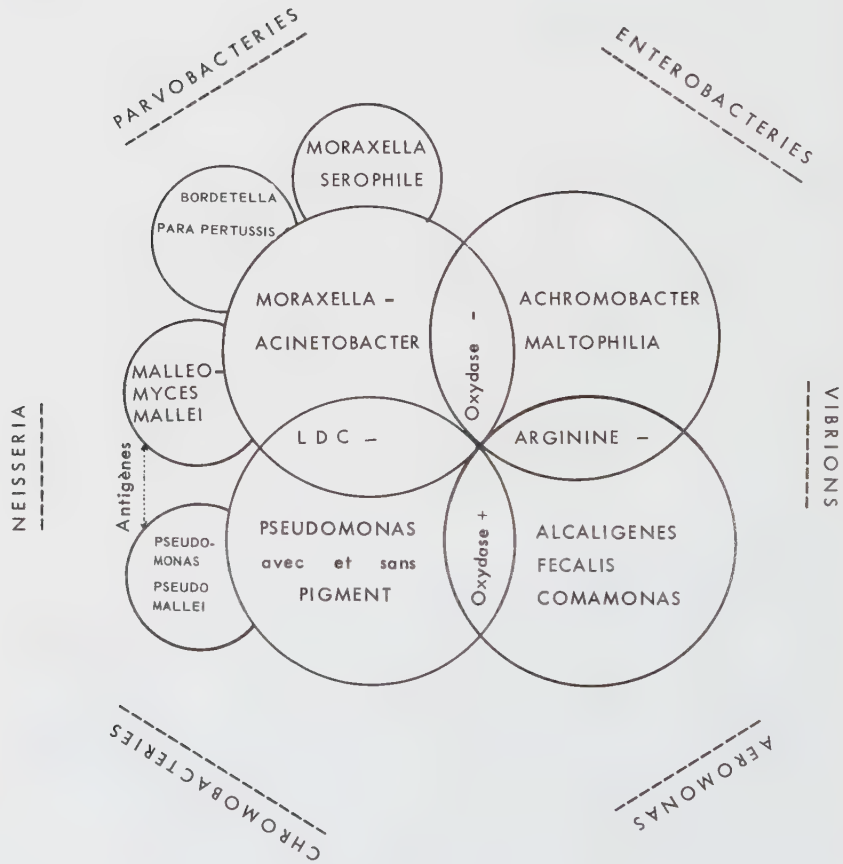
En effet, dans un prélèvement donné, on n'est en droit de soupçonner les caractères bactériologiques significatifs de ce groupe que lorsque les pathogènes traditionnels sont éliminés.

Notre travail permet de mettre en évidence la position de carrefour qu'ont parfois ces germes (Fig. II).

(*) L'une de ces dernières, la souche 43, 5 mois après son étude, vient d'élaborer un pigment fluorescent en milieu B. de KING. Ce qui confirme notre diagnostic de Pseudomonas.

FIGURE II

GERMES «CARREFOUR»



Ils occupent une position centrale par rapport à l'ensemble des familles de germes à Gram négatif, avec lesquelles ils présentent des rapports plus ou moins étroits.

1°- Les parvobactéries.

Celles-ci sont propres de notre groupe de germes par l'intermédiaire :

- des Moraxella sérophiles, classiquement décrites dans cette famille pour leurs caractéristiques culturales.
- de Bordetella parapertussis que L. ENJALBERT (65) et STEEL et COWEN (43) plus récemment, proposent d'inclure dans le genre Acinetobacter.

2°- Les Neisseria

Sont proches, pour des raisons morphologiques, de physiologie respiratoire et de réactions enzymatiques (oxydase).

3°- Les Enterobacteries

Touchent de près à certains de nos germes caractérisés par une réaction négative de l'oxydase.

4° - Les Vibrions (72) et Aeromonas (45).

Ont une morphologie ciliaire proche de certains de nos germes.

5°- Les Chromobacteries (50)

Par l'intermédiaire de leurs pigments, sont propres des Pseudomonas. Ce fait est particulièrement net, si l'on range Malleomyces pseudo mallei dans le genre Pseudomonas (2) puisque, comme eux, il élabore un pigment non diffusible.

6°- Malleomyces mallei.

Est proche de notre groupe à un double titre :

a) pour des raisons de communauté antigéniques avec Pseudomonas pseudo Mallei,

b) Puisque STEEL et COWEN (43) ont proposé d'inclure cette espèce dans le genre Acinetobacter.

Ce diagnostic différentiel est intéressant sur le plan théorique. Il est utile à connaître mais se pose rarement en pratique.

En fait, le diagnostic positif de cet ensemble repose sur des caractéristiques biochimiques essentiellement négatives.

Rappelons cependant la nécessité d'aborder ce diagnostic avec esprit critique avant d'accorder aux germes ainsi définis, un rôle pathogène.

Ceci étant, on se doit de suivre un plan d'examen fidèle et pratique que nous allons discuter.

VI - PLAN PROPOSE D'EXAMEN RAPIDE

Au terme de ce travail, il nous parait profitable de proposer un plan d'examen pratique de cet ensemble de germes. Il ne tient compte, pour chacun des genres que des réactions de différenciation essentielles au diagnostic. Ce plan est résumé dans le tableau VII. Nous en retiendrons la valeur essentielle de :

1°- L'examen à l'état frais, en corrélation avec ,

2°- les réactions couplées de l'oxydase et de la lysine decarboxylase,.

Dès que ces premières étapes obligatoires ont été réalisées, l'étude de l'oxydation du glucose pour le sous-groupe $\begin{matrix}\text{oxydase (-)}\\ \text{L.D.C. (+)}\end{matrix}$

l'étude de l'oxydation du maltose pour le sous-groupe $\begin{matrix}\text{oxydase (-)}\\ \text{L.D.C. (+)}\end{matrix}$

et de l'arginine pour le sous-groupe $\begin{matrix}\text{oxydase (+)}\\ \text{L.D.C. (-)}\end{matrix}$

permettent une identification suffisamment précise pour les besoins de la bactériologie clinique.

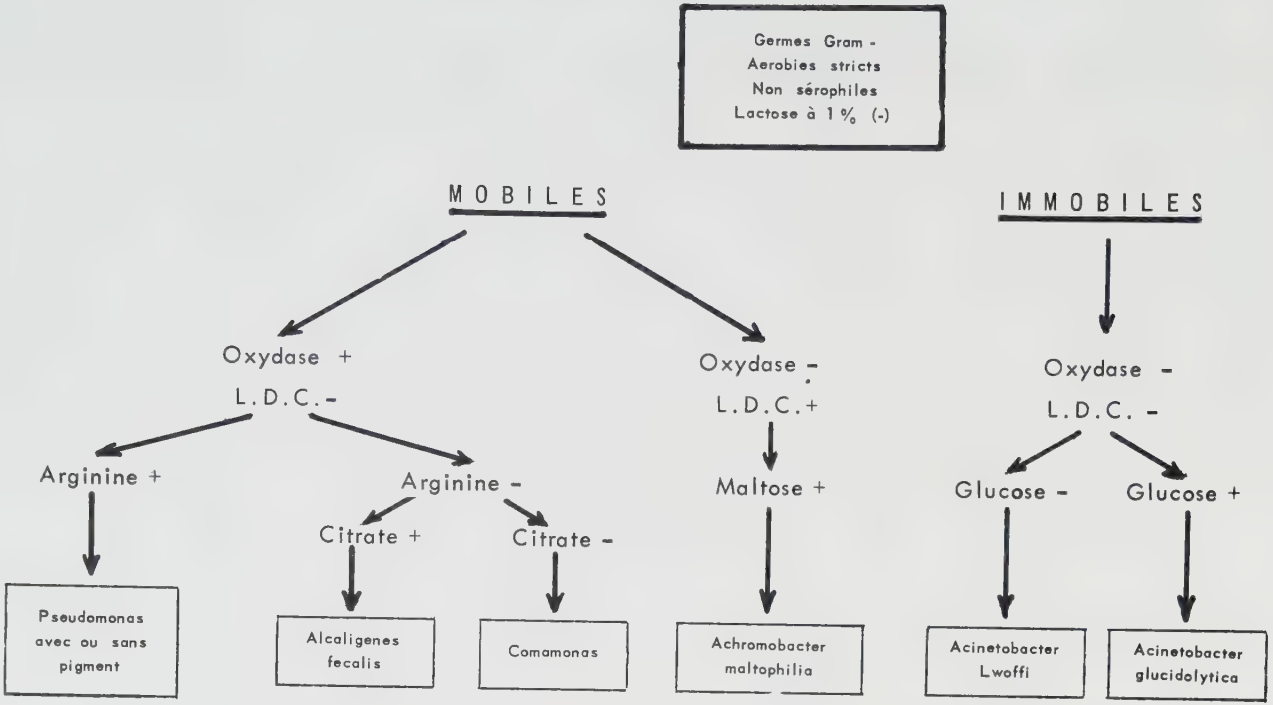
Cependant, nous ne nous dissimulons pas le caractère artificiel de la classification que nous avons été amenés à défendre et qui correspond aux caractéristiques d'une classification horizontale (62). En effet, pour pouvoir établir de manière scientifique l'autonomie de l'ensemble des germes que nous avons étudié, il faudrait recourir à des moyens fondamentaux (morphologie en microscopie électronique, étude des acides desoxyribonucléiques (63, 64), génétique bactérienne) qui correspondraient au critère d'une classification verticale (62).

L'une et l'autre approches de la réalité des faits sont nécessaires aux Bactériologistes.

Mais ce travail, en cherchant une réponse pratique à une question de diagnostic quotidien, fait appel aux possibilités réelles d'un Laboratoire de Bactériologie Clinique.

TABLEAU VII

PLAN PROPOSE D'EXAMEN RAPIDE



CONCLUSION

Dans le Laboratoire de la Chaire de Bactériologie de la Faculté Mixté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse, nous avons étudié du point de vue morphologique, biochimique, enzymologique, de la pigmentogénèse et de la sensibilité aux antibiotiques, 45 souches de germes gram négatif, aérobies strictes, non sérophiles, n'attaquant pas le lactose à la concentration usuelle.

L'étude comparative des différentes caractéristiques étudiées, permet de retenir un certain nombre de caractères communs à l'ensemble des germes examinés. Nous insistons sur la valeur des réactions enzymologiques qui permettent leur subdivision :

Oxydase, Lysine décarboxylase, Arginine dihydrolase,

en concordance étroite avec la morphologie ciliaire.

Au terme de ce travail, la critique des systématiques classiques apparait justifiée. Une terminologie est adoptée.

Un plan d'examen de cet ensemble de germes, utilisable aisément en bactériologie clinique, est proposé .

VU : Le Doyen
Pour le Doyen, l'Assesseur, P. BLANC.

Le Président,
L. ENJALBERT

Vu et permis d'imprimer
Toulouse, le 4 Décembre 1964
Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université :
A. LOYEN

BIBLIOGRAPHIE

(1) L. ENJALBERT. M.B. LARENG. L. LAPCHINE.
Toul. Med. 1962, 63; 551

(2) BERGEY'S MANUAL of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY.
7° édition - 1 volume.
Williams et Wilkins Cie Editeur, BALTIMORE 1957.

(3) DUMAS J.
BACTERIOLOGIE MEDICALE. Collection Médico-Chirurgicale à révision annuelle. 1 vol. - Flammarion Editeur . Paris.

(4) BRISOU J.
Ann. Inst. Pasteur. 1953, 84, 812.

(5) PREVOT A.R.
Traité de Systématique Bacterienne - Tome II
Dunod Editeur - Paris - 1961.

(6) BUTTIAUX R. GAGNON P.
Ann. Inst. Pasteur de Lille. 1958, 59, 121.

(7) COLLOQUE ANNUEL DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE.
Les problèmes actuels de l'identification des Pseudomonas, des Achromobacter et des bactéries analogues.
Ann. Inst. Pasteur 1961, supplément au N° 6

(8) THIBAULT P.
A propos d'Alcaligenes fecalis. In (7) p. 59

(9) CHASSIGNOL S.
Contribution à l'étude de germes du genre "Moraxella" (Acinetobacter). Thèse Lyon 1961.

(10) KAMBOU A.K.
Les Achromobactereae en clinique . (Etude de 45 souches).
Thèse, Toulouse, 1959.

(11) PETRUSCHKY J. Zbl. Bakt. 1896, 19, 187.

(12) BUTTIAUX R., BEERENS H. et TACQUET A.
Manuel de Techniques Bactériologiques. Flammarion Paris. 1962.

(13) LEIFSON E.
J. Bact. 1951, 62, 377

(14) RHODES M.E.
J. Gen. Microbiol. 1958, 18, 639.

(15) VERON M.
Pseudomonas pigmentés. In (7) p. 16

(16) MOORE H.B. PICKETT M.J.
Can. J. Microbiol. 1960, 6, 43.

(17) CASARES-GILL - Cité par Galli-Valerio . in Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 1915, 76, 233.

(18) HUGH. R. LEIFSON E. J. BACT. - 1953 - 66 - 24 .

(19) LE MINOR. Le diagnostic de laboratoire des Enterobactéries - 1 vol. - 2e Edition - Editions de la Tourelle - 1963

(20) KOHN J.
J. Clin. Path. 1953, 6, 250.

(21) EWING W.H.
Publication 737 de U.S. Enterobacteriaceae. Department of Health. Georgia. 1960.

(22) BRISOU J. TYSSET C.
C.R. Soc. Biol. 1962, 156, 1904

(23) THIBAULT P. LE MINOR L.
Ann. Inst. Pasteur. 1957, 92, 551.

(24) CHILTON M.L. FULTON Mc. D.
J. Lab. Clin. Med. 1946; 31; 824

(25) KING E.O. WARD M. RANCY D.E.
J . Lab. Clin. Med. 1954, 54, 301

(26) BOURSE R.
Bacille Pyocyanique et Antibiotiques.
Thèse Toulouse 1956.

(27) MONOD J. Growth. 1947, 11, 223.

(28) KARSTROM H. Ergeb. Enzymeforsch. 1930, 7, 350.

(29) LE MINOR L. BEN HAMIDA F.
Ann. Inst. Pasteur. 1962, 102, 267.

(30) LOWE G.H.
J. Gen. Microbiol. 1960, 23, 127.

(31) CHABBERT Y., COURTIEU A.L.
La sensibilité aux antibiotiques des Pseudomonas, Achromobacter et B 5W Bacterium Anitratum. in (7) p. 100

(32) PIECHAUD M.
Le groupe Moraxella. A propos des B5W- BACTERIUM ANITRATUM. in 7 p. 74.

(33) BUTTIAUX R.
Pseudomonas non pigmentés et Achromobacter. In colloque (7) p. 43

(34) LAUTROP H.
Intern. Bull. Bact. Nom. Taxon. 1961, 11, 107.

(35) PIECHAUD M.
Ann. Inst. Pasteur. 1963, 104, 291.

(36) LUTZ A. SCHEAFFER A. HOFFERER M.J.
Ann. Inst. Pasteur. 1958, 95, 49.

(37) ANDRIEU G. MONNIER J. BOURSE R.
Ann. Inst. Pasteur. 1957, 92, 176 et 322.

(38) HUGH R. RYSCHENKOW E.
J. Gen. Microbiol. 1961, 26, 123.

(39) GALARNEAULT T.P. LEIFSON E.
Canad. J. Microbiol. 1956, 2, 102.

(40) BUTTIAUX R. VOISIN C.
Ann. Inst. Pasteur Lille. 1958, 10, 151.

(41) LEIFSON E. HUGH R.
J. Bact. 1953, 65, 263.

(42) OLIVIER H.R.
Traité de Biologie Appliqué. Tome II. Librairie Maloine. 1963

(43) STEEL K.J. COWAN T.
Ann. Inst. Pasteur. 1964, 106, 479.

(44) BRULE M.
Contribution à l'étude des Vibrions.
Thèse - Bordeaux 1963.

(45) LECLERG H.
Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Nancy. 1962, 88, 12.

(46) BRISOU J.
Bull. Soc. Path. Exotique. 1961, 54, 71.

(47) SHEWAN J.M. HODGKISS W. LISTON J.
Nature. 1954, 73, 209.

(48) BRISOU J.
Rev. Med. Tours. 1961, 2, 431.

(50) DE RAUTLIN DE LA ROY Y.
Révision taxinomique et intérêt en pathologie des Bactéries Gram-négatif à pigments jaunes.
Thèse Toulouse 1960.

(51) CETIN E.T.
Ann. Inst. Pasteur. 1962, Tome 102, 750.

(52) BRISOU J. PREVOT A.R.
Ann. Inst. Pasteur. 1954, 86, 722

(53) PIECHAUD M. RYTER A.
Ann. Inst. Pasteur. 1963, 105, 1071.

(54) LEIFSON E.
Atlas of Bacterial Flagellation - 1 vol.
Academic Press, New York and London. 1960.

(55) LYSENKO O.
J. Gen. Microbiol. 1961, 25, 379.

(56) PARK R.W.A.
J. Gen. Microbiol. 1962, 27, 121

(57) CHRISTENSEN W.B.
J. Bact. 1946, 52, 461.

(58) FOUAD M.T.A. RICHARDS T.
Proc. Soc. appl. Bact. 1953, 16, 35.

(59) LAUTROP H.
Acta. Path.Microbiol. Scand. 1956, 39, 357.

(60) DAVIS F.H.H. PARK W.A.
J. Gen. Microbiol. 1962, 27, 101.

(61) MÖLLER V.
Acta. Path. Microbiol. Scand. 1955, 36; 158

(62) VERON M.
Path. Biol. 1964, 12, 605.

(63) SEBALD M. VERON M.
Ann. Inst. Pasteur. 1963, 105, 897.

(64) BOUISSET L. BREUILLAUD J. MICHEL G.
Ann. Inst. Pasteur. 1963, 104, 488.

(65) ENJALBERT L.
Problèmes actuels de l'identification des Pseudomonas, des Achromobacter et des Bactéries analogues. In colloque (7) p. 10

(66) RICHARD C.
Ann. Inst. Pasteur. 1964, 106, 653.

(67) HUGH R. RYSCHENKOW E.
Bact. Proc. 1960 , 78

(68) BRISOU J., TYSSET C., COURTIEU A., CADEILLAN J., BRISOU B.
Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Nancy 1962, 85, 1.

(69) SHERRIS J.C. SHOESMITH,J.G. PARKER M.T., BRECKON D.
J. Gen. Microbiol. 1959, 21, 389.

(70) THORNLEY M.J.
J. Appl. Bact. 1960; 23, 37

(71) TAYLOR J.J. WHITBY J.L.
J. Clin. Path. 1964, 17, 122.

(72) DAVIS G.H.G. PARK R.W.A.
J. Gén. Microbiol. 1962, 27, 101.

(73) LE MINOR, L., PIECHAUD M.
Ann. Inst. Pasteur 1963. 105 - 792.

(74) LAGODSKY H. , Mlle JANDARD
Ann. Inst. Pasteur 1964 - 107 - 128.